20.1001.1.27834409.1401.38.1.4.2
10.22092/spj.2023.360114.1276

"مجله نهال و بذر"
جلد ۳۸، شماره ۱، سال ۱۴۰۱

مقاله پژوهشی

ارتباط سطح مقاومت به بیماری آتشک (*Erwinia amylovora*) با تنش اکسیداتیو کلروپلاستی و میتوکندریائی در دو رقم گلابی هاروسوئیت و بارتلت

Association of Resistance Level to the Fire Blight (*Erwinia amylovora*) Disease with Chloroplastic and Mitochondrial Oxidative Stress in Two Pear Cultivars Harrow Sweet and Bartlett

محدثه سیدی[1] و حمید عبداللهی[2*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، بخش بیوتکنولوژی کشاورزی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- دانشیار، پژوهشکده میوه های معتدله وسردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۶

چکیده

سیدی، م. و عبداللهی، ح. ۱۴۰۱. ارتباط سطح مقاومت به بیماری آتشک (*Erwinia amylovora*) با تنش اکسیداتیو کلروپلاستی و میتوکندریائی در دو رقم گلابی هاروسوئیت و بارتلت. **مجله نهال و بذر ۳۸:** ۹۰-۷۱.

تنش اکسیداتیو ناشی از باکتری بیماری آتشک در گیاه میزبان شامل دو تنش اکسیداتیو کلروپلاستی و میتوکندریائی است و این تنش در نهایت منجر به بروز نکروز در بافت‌ها می‌شود. این پژوهش با هدف مقایسه سهم دو اندامک کلروپلاست و میتوکندری در ایجاد نکروز بیماری با استفاده از بازدارنده زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی گلوتارآلدهید و میتوکندریائی روتنون در دو رقم گلابی (بارتلت و هاروسوییت) انجام شد. با توجه به تاثیر نکروززائی دو بازدارنده فوق، در آزمایش‌های مقدماتی غلظت بهینه گلوتارآلدهید و روتنون در شرایط درون شیشه تعیین و با توجه به تاثیر یکسان غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر دو بازدارنده، این غلظت‌ها برای ارزیابی کشت توام باکتری و میزبان مورد استفاده قرار گرفتند. در بررسی اثر متقابل باکتری با ارقام گلابی، ظهور نکروز در رقم حساس بارتلت و متحمل هاروسوئیت به ترتیب ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از آلوده‌سازی مشاهده شد. لیکن استفاده از بازدارنده روتنون و گلوتارآلدهید در هر دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، تاخیر در زمان ظهور اولین علائم و کاهش سرعت پیشرفت نکروز را در هر دو رقم به همراه داشت. در رقم هاروسوئیت، تاثیر بیشتر بازدارنده گلوتارآلدهید در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر دیده شد. تاثیر بیشتر بازدارنده کلروپلاستی گلوتارآلدهید در شدت بازدارندگی تقریباً یکسان با بازدارنده میتوکندریائی روتنون بیانگر احتمال تاثیر بیشتر زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی در تنش اکسیداتیو حاصل از بیماری آتشک در میزبان بود. علاوه بر این، در رقم حساس بارتلت در شرایط استفاده از بازدارنده میتوکندریائی میزان نزدیکی سرعت پیشرفت علائم نکروز نسبت به شرایط استفاده از بازدارنده کلروپلاستی بیشتر بود که می‌تواند دلیلی بر نقش موثرتر کلروپلاست در تحمل به آتشک در رقم متحمل هاروسوئیت باشد.

واژه‌های کلیدی: گلابی، نکروز، اندامک، گلوتارآلدهید، روتنون، زنجیره انتقال الکترون.

* نگارنده مسئول: h.abdollahi@areeo.ac.ir تلفن: ۰۲۶۳۶۷۰۲۵۴۱

مقدمه

بیماری آتشک (Fire blight) با عامل باکتریائی *Erwinia amylovora* مهمترین بیماری درختان میوه دانه‌دار محسوب شده (Oh and Beer, 2005) که هر ساله سبب بروز خسارات فراوانی بر روی درختان این زیرخانواده و به‌ویژه دو درخت به (*Cydonia oblonga* Mill.) و گلابی معمولی (*Pyrus communis* L.) در کشورهای مختلف جهان از جمله ایران می‌شود (Abdollahi, 2010; Steiner, 2000). در میان راهکارهای مختلف کنترل و مدیریت بیماری آتشک، استفاده از ارقام مقاوم و یا متحمل به بیماری، بی‌تردید موثرترین و اقتصادی‌ترین راهکار محسوب می‌شود (van der Zwet and Keil, 1979).

در دهه‌های گذشته، تحقیقات متعددی در زمینه ارزیابی مقاومت و گزینش ارقام برتر و دارای تحمل بالا به بیماری آتشک در درختان سیب (Aldwinckle and Preczewski, 1976; Tsiantos and Psallidas, 2004)، گلابی (Oitto *et al*., 1970; Tsiantos and Psallidas, 2004; Erfani *et al*., 2013) و به (Bell *et al*., 2004) انجام و نسبت به معرفی و ارائه ارقام و ژنوتیپ‌های مقاوم‌تر این درختان اقدام شده است. گزینش ارقام و ژنوتیپ‌های مقاوم به بیماری آتشک با استفاده از نشانگرهای مولکولی و بیوشیمیائی ضمن کوتاه کردن مسیر طولانی تکثیر و ارزیابی مقاومت ارقام، هزینه‌های گزینش را به‌طور قابل توجهی کاهش می‌دهد. نشانگرهای مولکولی در مطالعات متعددی برای گزینش نتاج دورگ درختان میوه دانه‌دار که دارای قدرت تحمل یا مقاومت به بیماری آتشک باشند، مورد استفاده قرار گرفته است.

از نشانگرهای مولکولی در تحقیقات متعددی در رابطه با گزینش نتاج دورگ درختان میوه دانه‌دار توسط خان و همکاران (Khan *et al*., 2007) در رابطه با سیب، گلابی گونه یوزوری (*P. ussuriensis*) توسط بوکزازانین و همکاران (Bokszczanin *et al*., 2009)، در رابطه با سیب رقم اورست (Everste) و کلون ۸۲۱ از گونه سیب *Malus floribunda* توسط دورل و همکاران (Durel *et al*., 2009)، در رابطه با ارقام سیب فیستا (Fiesta)، دیسکاوری (Discovery) و پریما (Prima) توسط کالنگه و همکاران (Calenge *et al*., 2005)، در رابطه با گلابی گونه *P. communis* توسط دوندینی و همکاران (Dondini *et al*., 2004) و در رابطه با ارقام و ژنوتیپ‌های گلابی بومی ایران توسط عرفانی و همکاران (Erfani *et al*., 2013) استفاده شده است.

بررسی‌های اخیر نشان می‌دهد با توجه به ماهیت کمّی تحمل به بیماری آتشک، استفاده از نشانگرهای مولکولی وابسته به DNA به خوبی قادر به شناسائی ارقام و ژنوتیپ‌های مقاوم و یا متحمل نبوده و به نظر می‌رسد با توجه به منشاء مقاومت در گونه‌های شرقی گلابی

به‌ویژه گونه *P. ussuriensis*، نشانگرهای فوق بیشتر با منشاء ژنوتیپ‌ها و کمتر با ساختار مقاومت به بیماری آتشک در ارتباط باشند (Erfani *et al*., 2013).

بر این اساس، علاوه بر ارزیابی نشانگرهای مولکولی وابسته به DNA، مقایسه پاسخ‌های مولکولی وابسته به ترانسکریپتوم نیز در پاسخ به حمله عامل بیماری آتشک در گیاهان میزبان نظیر سیب (Sarowar *et al*., 2011; Baldo *et al*., 2010) و گلابی (Vrancken *et al*., 2012) انجام و برخی سازکارها به صورت عمومی و غیردقیق نظیر سنتز اسید سالیسیلیک، فنیل‌پروپانوئیدها و آنزیم‌های درگیر در ساختار دفاع ضداکسایشی گزارش شده است. بررسی ترانسکریپتومی سلول‌های میزبان در پاسخ به حمله عامل بیماری آتشک اگرچه اطلاعات نسبتاً دقیق تری در رابطه با مسیرهای احتمالی مقاومت به بیماری را آشکار نموده، لیکن این بررسی‌ها نیز قادر به تعیین دقیق سازکار و ساختارهای سلولی مقاومت در بین ارقام و ژنوتیپ‌ها نبوده است.

علاوه بر بررسی‌های انجام شده مبتنی بر نشانگرهای مولکولی وابسته به DNA و واکنش ترانسکریپتومی سلول‌های میزبان در پاسخ به حمله عامل بیماری آتشک، بررسی‌های بیوشیمائی نشان داده‌اند که اساس ساختار ایجاد بیماری و پیشرفت نکروز در بافت‌های میزبان با بروز یک تنش اکسیداتیو و تولید گونه‌های مختلف اکسیژن فعال همراه است (Venisse *et al*., 2001, 2002). براین‌اساس هر تفاوتی در منشاء، میزان، شدت و تعادل گونه‌های مختلف اکسیژن فعال به‌ویژه سه گونه اصلی درگیر در تنش اکسیداتیو بیماری در میزبان شامل سوپراکسید ($O_2^{\bullet -}$)، پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) و هیدروکسیل ($OH^{\bullet -}$) (Azarabadi *et al*., 2014; Abdollahi and Salehi, 2017) می‌تواند به نحو مطلوب تری بیانگر چگونگی ساختارهای حساسیت و یا مقاومت به بیماری باشد. بررسی‌ها بیانگر منشاء تولید گونه‌های مختلف اکسیژن فعال در کلیه تنش‌های اکسیداتیو در سه اندامک پراکسیزوم‌ها، میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها در سلول‌های گیاهی می‌باشد (Bhattacharjee, 2011).

براساس گزارش های سایر پژوهشگران دو اندامک میتوکندری (Xie and Chen, 2000; Azarabdi *et al*., 2016) و کلروپلاست (Abdollahi *et al*., 2015) به عنوان اصلی‌ترین و کلیدی‌ترین ساختارهای درگیر در تنش اکسیداتیو عامل بیماری آتشک در اثر متقابل سازگار با میزبان و اثر متقابل غیرسازگار با گیاهان غیرمیزبان می باشند که منجر به واکنش فوق حساسیت می‌شوند. عبداللهی و صالحی (Abdollahi and Salehi, 2017) گزاش کردند که تفاوت قابل‌توجهی در سرعت و شدت گونه‌های مختلف اکسیژن فعال به ویژه دو گونه پراکسیدهیدروژن و هیدروکسیل در ارقام مختلف گلابی با سطح تحمل مختلف به بیماری آتشک مشاهده شد. گزارش این

پژوهشگران بیانگر دو ساختار متفاوت شامل ساختار اول در رقم مقاوم به بیماری درگزی با تولید بسیار کم پراکسیدهیدروژن و تبدیل کم این پیشساز به رادیکال هیدروکسیل و ساختار دوم در رقم متحمل هاروسوئیت با تولید قابل توجه پراکسیدهیدروژن به عنوان بازدارنده رشد و توسعه باکتری در بافت‌های میزبان و کاهش تبدیل آن به رادیکال هیدروکسیل است. از یک سو، سازکار واکنش متفاوت دو رقم مقاوم درگزی و متحمل هاروسوئیت در برابر حمله عامل بیماری آتشک، شناخته شده نیست، از سوی دیگر، ارتباط دو منشاء اصلی تولید گونه‌های مختلف اکسیژن فعال یعنی میتوکندری و کلروپلاست و میزان تاثیرگذاری این دو اندامک نیز به طور کامل در این اثر متقابل ناشناخته است.

با توجه به اهمیت شناخت منشاء تنش اکسیداتیو در بروز سطوح متفاوت مقاومت به بیماری آتشک در بافت‌های گیاه میزبان، این پژوهش با هدف ارزیابی مقایسه‌ای اثر دو اندامک میتوکندری و کلروپلاست، با استفاده از بازدارنده‌های زنجیره انتقال الکترون این دو اندامک، بر واکنش دورقم گلابی هاروسوئیت و بارتلت به بیماری آتشک انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و جدایه باکتری

این پژوهش به منظور بررسی واکنش دورقم گلابی، رقم حساس ویلیامز (Williams) با نام معادل بارتلت (Bartlett) (van der Zwet and Keil, 1979) و رقم متحمل هاروسوئیت (Harrow Sweet)، به بیماری آتشک در سال ۱۳۹۷ در آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی در کرج انجام شد. برای ارزیابی مقاومت در شرایط درون‌شیشه، ارقام فوق به وسیله کشت ریزقلمه در محیط درون شیشه مستقر شدند.

به این منظور، این دورقم پس از استقرار در شرایط درون شیشه، به محیط QL تغییر یافته براساس روش لبلای و همکاران (Leblay *et al.*, 1991) با افزایش میزان کلسیم به ۶/۴ میلی‌مول، آمونیوم به ۷/۵ میلی‌مول و نیترات به ۳۷/۶ میلی‌مول در مقایسه با QL معمولی (Quoirin and Lepoivre, 1977; Abdollahi *et al.*, 2005) و با نسبت تنظیم‌کننده‌های رشد بهینه‌سازی شده برای گلابی‌های گونه *P. communis* L. براساس روش نورمحمدی و همکاران (Nourmohammadi *et al.*, 2015) شامل یک میلی‌گرم بر لیتر BA، یک میلی‌گرم بر لیتر 2iP (6-γ,γ-Dimethylallylaminopurine) (Sigma-Aldrich, Catalog No. D5912)، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و همچنین یک گرم بر لیتر پکتین مرکبات، منتقل شدند. همچنین مواد گیاهی مورد استفاده با فواصل زمانی شش

هفته یک‌بار زیرکشت شدند.

مقایسه و تفکیک میزان تاثیر زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست و میتوکندری با استفاده از بازدارنده‌های هر زنجیره و در نتیجه فعال نگاه داشتن دیگر زنجیره مطابق پروتکل بررسی‌های فتوسنتزی (Heldt, 2005) و تنفسی (Moller, 2001) انجام شد. برای بازدارنده کلروپلاستی از بازدارنده گلوتارآلدهید و برای بازدارنده میتوکندریائی از بازدارنده روتنون (غیرسمی برای سلول‌های انسانی) استفاده شد. قبل از انجام آزمایش، با توجه به تاثیر نکروززائی بازدارنده‌های زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست و میتوکندری و با هدف ایجاد بازدارندگی موثر و همچنین عدم ظهور نکروز شدید، غلظت بهینه بازدارنده‌ها در این پژوهش برای حدود ۱۶۸ ساعت (هفت روز) تعیین شد.

برای بهینه‌سازی غلظت‌های بازدارنده‌های زنجیره انتقال الکترون دو اندامک فوق با اضافه کردن میزان هر بازدارنده در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر همراه با شاهد بدون بازدارنده با استفاده از فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرومتر در شرایط سترون به محیط کشت انجام شد. پس از اضافه کردن بازدارنده‌ها، شاخه‌چه‌های درون شیشه از ارقام مورد نظر روی محیط مستقر و طی مدت ۵۰ روز پس از زیرکشت، بروز نکروز (نکروز بازدارنده) با هدف ارزیابی میزان تاثیر بازدارنده روی بافت ارقام گلابی و همچنین دوره بدون نکروز اولیه ارزیابی شد. در این بررسی از هیچ‌گونه مایه تلقیح باکتریائی *E. amylovora* استفاده نشد.

پس از تعیین غلظت بهینه بازدارنده‌های زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست و میتوکندری، میزان تاثیر زنجیره انتقال الکترون هر اندامک با استفاده از کشت توام باکتری *E. amylovora* و ارقام میزبان در حضور غلظت‌های بهینه بازدارنده انجام شد. غلظت‌های مورد استفاده در این بخش دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب برای گلوتارآلدهید و روتنون بودند. برای تهیه مایه تلقیح باکتری، سویه Ea273 عامل بیماری (ATCC No. 49946, USA) در محیط کشت لوریا-برتانی (LB) مایع، شب‌گذران شد. مایه‌زنی مواد گیاهی درون‌شیشه، براساس روش عبداللهی و همکاران (Abdollahi *et al*., 2004) انجام شد. غلظت مایه تلقیح مورد استفاده در بافر فسفات خنثی (pH برابر ۷) اتوکلاو و روی کدورت دو (OD=2)، به منظور به حداقل رساندن احتمال فرار سرشاخه‌ها از آلودگی، تنظیم گردید.

برای کشت توام میزبان-باکتری، ۷۵ میکرولیتر مایه تلقیح باکتری به لوله آزمایش حاوی محیط کشت QL اضافه شد و سپس ریزشاخه‌چه‌های سه تا چهار سانتی‌متری که دارای طول میانگره‌های یکنواختی بودند، در محیط مستقر شدند. مقایسه سرعت پیشرفت

نکروز براساس شاخص درصد طول شاخه‌چه نکروزه به طول کل شاخه‌چه در بازه زمانی پس از آلوده‌سازی براساس حداکثر زمان مورد نیاز برای رسیدن نکروز به ۱۰۰ درصد در شاخه‌چه‌های هر دو رقم گلابی و با فواصل زمانی ۲۴ ساعت انجام شد.

کلیه آزمایش‌ها در پنج تکرار انجام شد. محاسبات آماری و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل (Microsoft Excel-USA, 2007) انجام گردید.

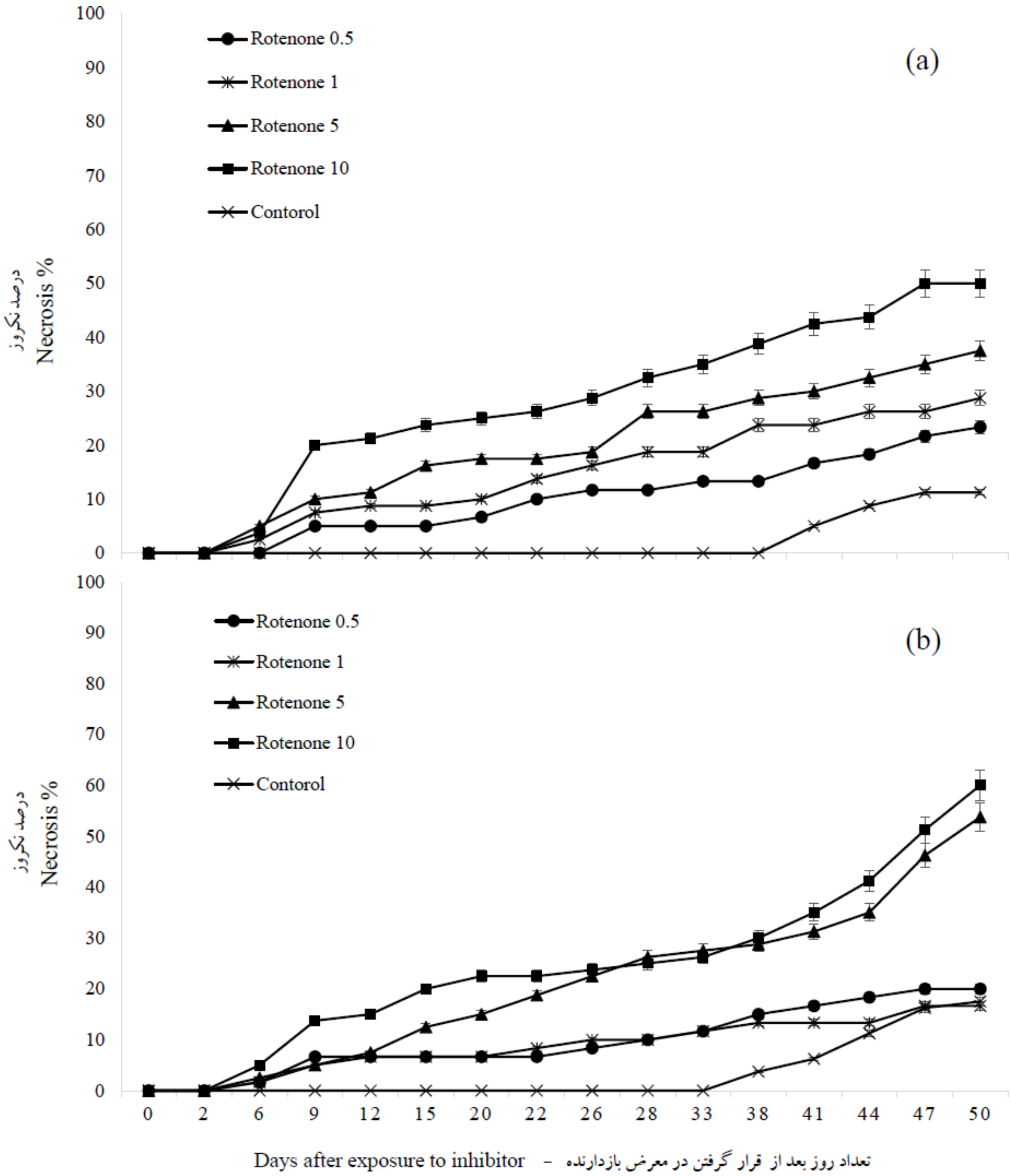
نتایج و بحث

نتایج حاصل از این پژوهش بیانگر تاثیر مثبت بازدارنده‌های زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست و میتوکندری در ایجاد نکروز در بافت ارقام گلابی هاروسوییت و بارتلت بود. بروز نکروز بستگی به غلظت مواد بازدارنده و مدت زمان حضور سرشاخه در محیط حاوی بازدارنده داشت. بنابراین نتایج پژوهش در دو بخش شامل: تعیین میزان بهینه بازدارنده‌های زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست و میتوکندری و تاثیر هر اندامک و بازدارندگی آن روی ظهور و پیشرفت علائم نکروز باکتری *E. amylovora* ارائه شده است.

میزان بهینه بازدارنده‌ها

در شرایط استفاده از بازدارنده روتنون به عنوان بازدارنده زنجیره انتقال الکترون میتوکندری، نکروز حاصل از این بازدارنده پس از ۴۸ ساعت (دو روز) از استقرار بر روی سرشاخه‌های هر دو رقم گلابی هاروسوئیت و بارتلت مشاهده شد (شکل ۱). با افزایش غلظت بازدارنده از ۰/۵ به ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، سرعت افزایش نکروز سرشاخه‌های هر دو رقم تا حدی افزایش یافت. میزان نکروز نهائی در اثر استفاده از این بازدارنده در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر در رقم هاروسوئیت حدود ۵۰ درصد و در رقم بارتلت حدود ۷۰ درصد بود (شکل ۱). از سوی دیگر در شرایط عدم حضور بازدارنده زنجیره انتقال الکترون میتوکندری هیچگونه علائم نکروزی پس از گذشت ۳۳ روز در رقم هاروسوئیت و ۳۸ روز در رقم بارتلت مشاهده نشد (شکل ۱). عدم بروز علائم نکروز طی این مدت در شرایط بدون بازدارنده و برعکس بروز نکروز در شرایط حضور بازدارنده، بیانگر تاثیر مثبت آن در ایجاد بازدارندگی زنجیره انتقال الکترون میتوکندریائی بود.

بروز نکروز کمتر از ۱۰ درصد مشاهده شده، در شرایط بدون بازدارنده، در شرایط کشت درون شیشه ارقام گلابی پس از حدود ۳۰ روز طبیعی و در بررسی‌های قبلی نیز بروز درصد ناچیزی از نکروز در بخش‌های مریستمی سرشاخه‌های این گونه گزارش شده است (Abdollahi *et al.*, 2005). در بررسی دیگری روی گونه گلابی معمولی، حذف ساکاروز از محیط کشت که با هدف فعال سازی زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست (Abdollahi *et al.*, 2017) مورد استفاده قرار گرفت، نیز تاحدودی



شکل ۱- میانگین زمان ظهور و روند پیشرفت نکروز در شاخه‌چه‌های درون شیشه گلابی رقم هاروسوئیت (a) و بارتلت (b) پس از قرار گرفتن در معرض غلظت‌های مختلف بازدارنده زنجیره انتقال الکترون میتوکندریائی روتنون (غلظت‌ها میلی‌گرم بر لیتر می باشند). نوارهای خطا اشتباه استاندارد میانگین ها را نشان می دهند

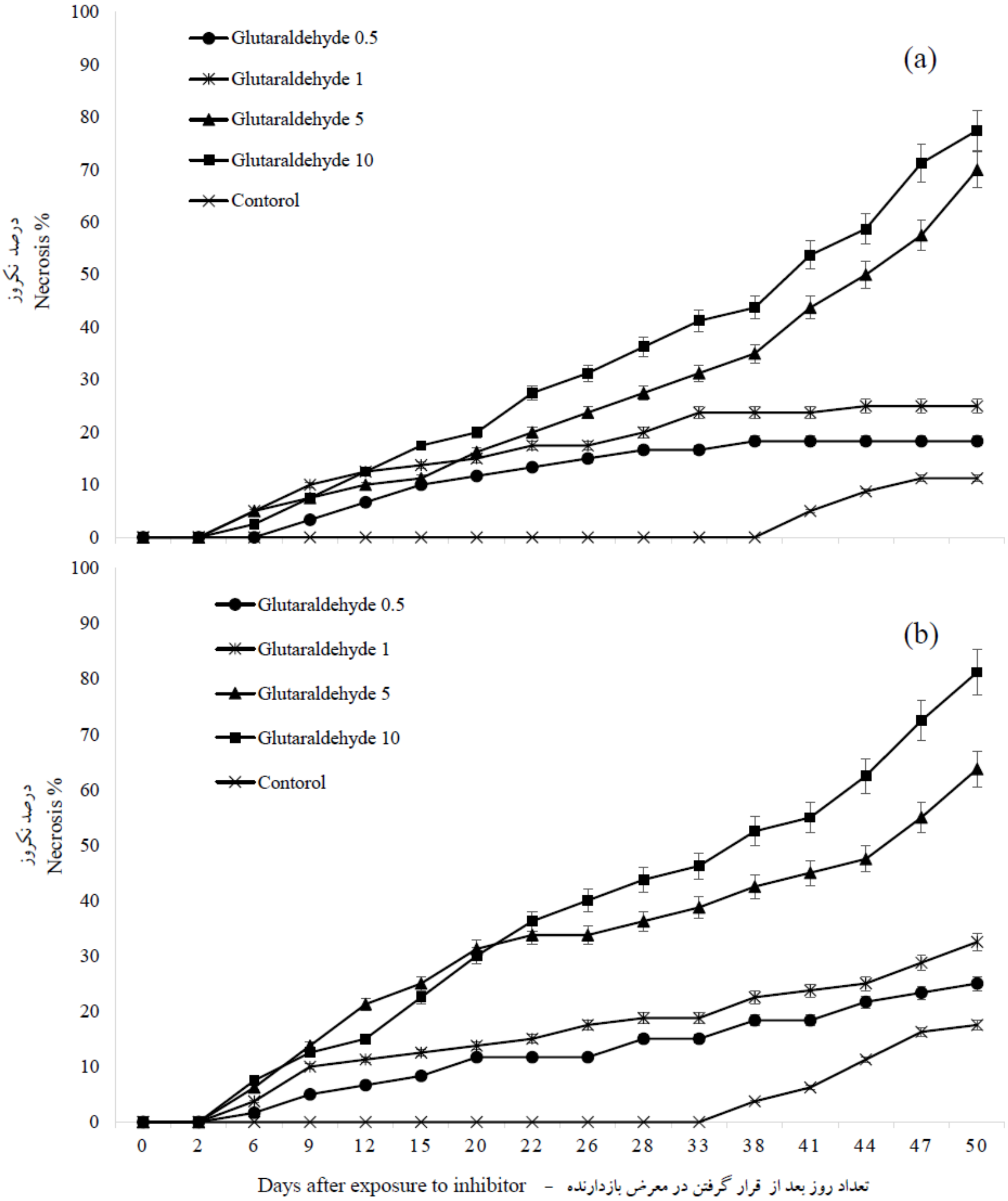
Fig. 1. Mean of appearance time and the trend of necrosis progress in *in vitro* shootlets of pear cv. Harrow Sweet (a) and cv. Bartlett (b) after exposure to different concentrations of mitochondrial electron transport chain inhibitor rotenone (concentrations are mg l^{-1}). The error bars represent standard error of the means

نکروز سرشاخه‌های گلابی و به‌ویژه سیب را در شرایط درون شیشه افزایش داد (داده‌های منتشر نشـــده). در کلیـــه غلظـــت‌هـــای روتنـــون مـورد استفاده، طـی حـدود ۱۶۸ ساعت اولیـه، نیـز میـزان نکـروز نـاچیزی مشـاهده شـد، بنابراین در آزمایشات بعـدی بـرای کشـت تـوام بـاکتری *E. amylovora* بـا ارقـام گلابـی، کلیه غلظت‌های روتنون و بـه‌ویـژه غلظـت‌هـای ۵ و ۱۰ میلـی‌گـرم بـر لیتـر آن کـه بـالاترین میـزان بازدارنـدگی را بـه همـراه داشـت، استفاده شد.

استفاده از گلوتارآلدهید به عنـوان بازدارنـده زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست نشان داد کـه نتایج تا حد زیادی شبیه به کاربرد روتنـون بـود. در این شرایط، نکروز حاصـل از ایـن بازدارنـده ۴۸ ساعت پس از استقرار بر روی سرشاخه‌هـای هر دو رقم مشاهده شـد (شـکل ۲). همچنـین بـا افزایش غلظت بازدارنده گلوتارآلدهید از ۰/۵ به ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، سرعت پیشرفت نکـروز بـر روی سرشاخه‌هـای هـر دو رقـم افـزایش یافـت. میـزان نکـروز نهـائی در اثـر اسـتفاده از ایـن بازدارنده در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر در رقـم هاروسوئیت حدود ۸۰ درصد و در رقم بارتلـت حدود ۹۰ درصـد بـود (شـکل ۲). ایـن موضـوع تـاثیر نسـبتاً بیشـتر گلوتارآلدهیـد در مقایسـه بـا روتنون را در بازدارندگی نشان می‌دهد. براساس نتـایج ایـن پـژوهش، در شـرایط عـدم حضـور بازدارنده زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی، بـا گذشت بیش از ۳۰ روز هیچ‌گونه علائم نکـروز در دو رقم گلابی مـورد بررسـی مشـاهده نشـد (شکل ۲).

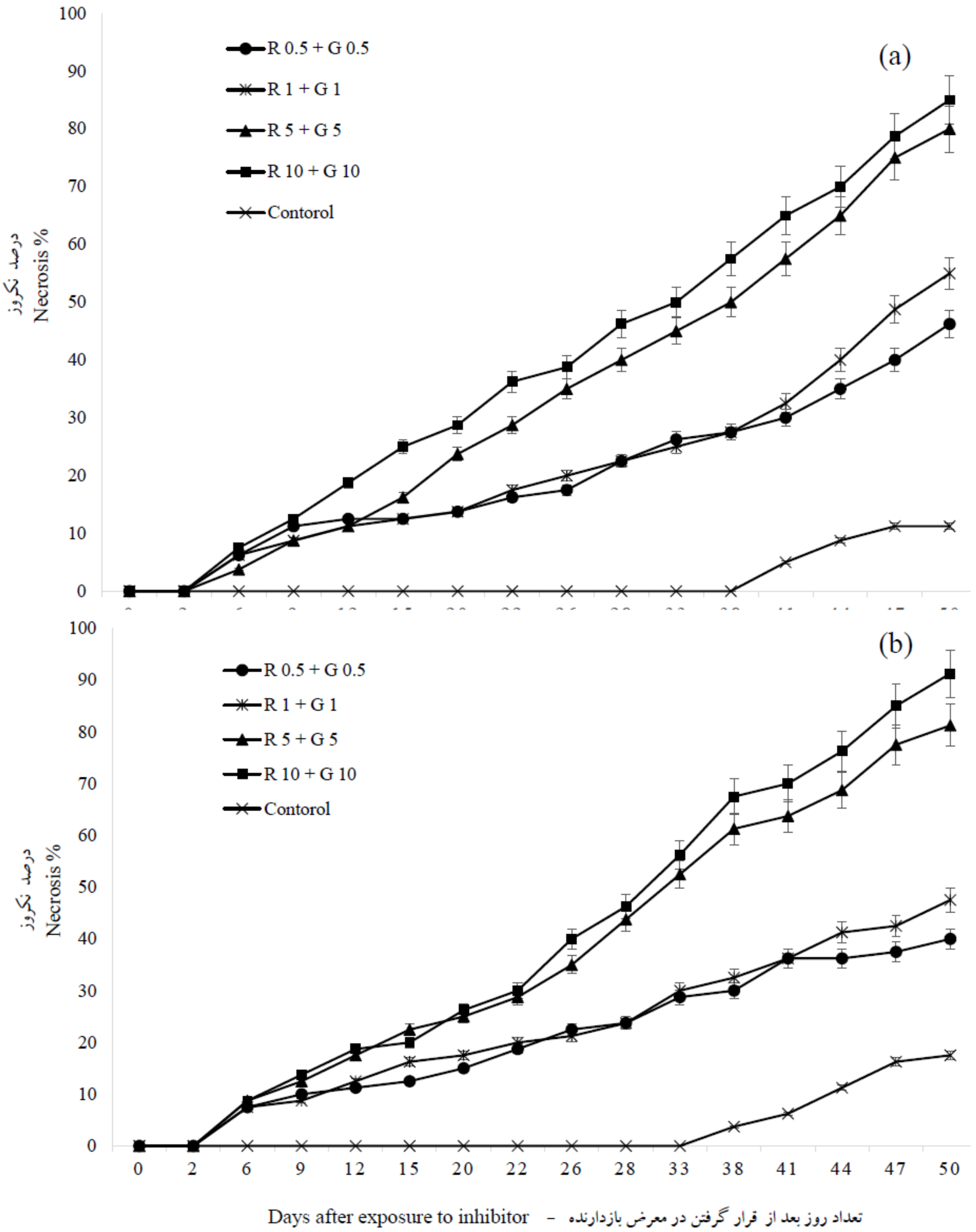
عـدم بـروز علائـم نکـروز طـی ایـن مـدت در شـرایط بـدون بازدارنـده و بـرعکس بـروز نکـروز سریع در شرایط حضـور بازدارنـده گلوتارآلدهیـد بیانگر تاثیر مثبت آن در ایجاد بازدارندگی زنجیـره انتقال الکتـرون کلروپلاسـت اسـت. ایـن نتیجـه بـا نتـایج عبـداللهی و همکـاران (Abdollahi *et al*., 2017) در رابطه با گونه سیب مطابقـت دارد. کلیـه غلظت‌های گلوتارآلدهید، طی حدود ۱۶۸ سـاعت اولیـه، میـزان نکـروز نـاچیزی داشـتند. بنـابراین در آزمایشـات بعـدی بـرای کشـت تـوام بـاکتری *E. amylovora* با ارقام گلابی، کلیه غلظـت‌هـای ایـن بازدارنـده و بـه‌ویـژه غلظـت‌هـای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر آن که بالاترین میزان بازدارنـدگی را نیز به همراه داشت، استفاده شد.

نتایج آزمایشات استفاده توام از دو بازدارنده زنجیـــره انتقـــال الکتـــرون کلروپلاســـت و میتوکندری (گلوتارآلدهید و روتنون)، همانند شرایط قبل بـود، لـیکن در ایـن حالـت بـا توجـه بـه بازدارنـدگی تـوام دو زنجیـره کلروپلاسـت و میتوکندری، سرعت پیشرفت نکـروز افـزایش و در رقم هاروسوئیت در غلظـت ۱۰ میلـی‌گـرم بـر لیتـر هـر دو بازدارنـده بـه ۹۰ درصـد و در رقم بارتلت به ۱۰۰ درصد رسـید (شـکل ۳). در غلظت‌های توام گلوتارآلدهیـد و روتنـون، طـی حـدود ۱۶۸ سـاعت اولیـه، نیـز میـزان نکـروز



شکل ۲- میانگین زمان ظهور و روند پیشرفت نکروز در شاخه‌چه‌های درون شیشه گلابی رقم هاروسوئیت (a) و بارتلت (b) پس از قرار گرفتن در معرض غلظت‌های مختلف بازدارنده زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی گلوتارآلدهید (غلظت ها میلی‌گرم بر لیتر می باشند). نوارهای خطا اشتباه استاندارد میانگین ها را نشان می دهند

Fig. 2. Mean of appearance time and the trend of necrosis progress in *in vitro* shootlets of pear cv. Harrow Sweet (a) and cv. Bartlett (b) after exposure to different concentrations of chloroplastic electron transport chain inhibitor glutaraldehyde (concentration are mg l^{-1}). The error bars represent standard error of the means



شکل ۳- میانگین زمان ظهور و روند پیشرفت نکروز در شاخه‌چه‌های درون شیشه گلابی رقم هاروسوئیت (a) و بارتلت (b) پس از قرار گرفتن در معرض غلظت‌های توام بازدارنده‌های زنجیره انتقال الکترون میتوکندریائی روتنون (R) کلروپلاستی گلوتارآلدهید (G) (غلظت‌ها میلی‌گرم بر لیتر می باشند). نوارهای خطا اشتباه استاندارد میانگین ها را نشان می دهند

Fig. 3. Mean of appearance time and the trend of necrosis progress in *in vitro* shootlets of pear cv. Harrow Sweet (a) and cv. Bartlett (b) after exposure to different concentrations of both electron transport chain inhibitors of mitochondrial rotenone (R) and chloroplastic glutaraldehyde (concentrations are mg l^{-1}). The error bars represent standard error of the means

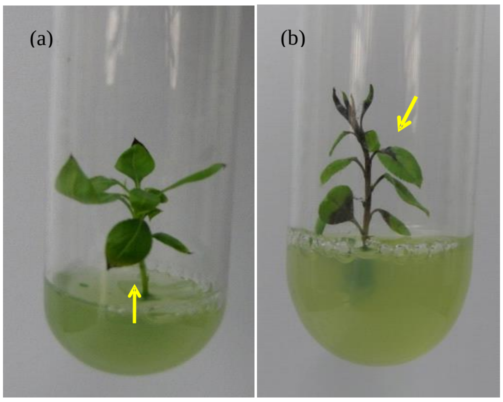
ناچیزی بروز کرد. بنابراین در آزمایشات بعدی برای کشت توام باکتری *E. amylovora* با ارقام گلابی، کلیه غلظت‌های توام این بازدارنده و به‌ویژه غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر آنها انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت.

از سوی دیگر نکروز ناچیز، در حدود ۱۰ درصد، که طی روزهای اولیه استقراربر روی شاخه‌چه‌های درون شیشه ارقام گلابی مشاهده شد، کاملاً متعلق به بخش‌های برگ بود و هیچگونه نکروز ساقه‌چه طی حدود ۱۶۸ ساعت اولیه و حتی بیشتر مشاهده نشد. این در حالی است که براساس مشاهدات قبلی، پیشرفت نکروز باکتری در ساقه‌چه‌ها بود و نکروز برگی در شرایط کشت توام باکتری با گیاه میزبان بروز نکرد (Abdollahi *et al*., 2004). این نکته از این جهت داری اهمیت است که وجود بافت‌های متفاوت برای بروز نکروز اولیه حاصل از بازدارنده و باکتری طی ساعات اول، سبب تداخل نکروز ناچیز و اندک مشاهده شده طی روزهای اولیه نخواهد شد. بنابراین غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر بازدارنده‌ها بدون احتمال بروز تداخل کمترین میزان نکروز برای آزمایش‌های کشت توام استفاده شد.

نکروز باکتری

نکروز ناشی از باکتری از قاعده شاخه‌چه‌های درون شیشه آغاز شد که با محل آغازش نکروز حاصل از استفاده از بازدانده‌های زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی و میتوکندریائی کاملاً متفاوت بود (شکل ۴). استفاده از باکتری *E. amylovora* در کشت توام با دو رقم گلابی، با دو سطح متفاوت تحمل به بیماری آتشک در شرایط درون شیشه، سبب ظهور اولین علائم نکروز پس از گذشت ۴۸ ساعت در رقم حساس بارتلت و ۷۲ ساعت در رقم متحمل هاروسوئیت شد (شکل ۵). همچنین سرعت پیشرفت علائم نکروز در رقم حساس سریع‌تر و در رقم متحمل کندتر بود. این نتایج با گزارشات متعدد قبلی مبنی بر وجود صرفاً تفاوت در سرعت پیشرفت نکروز در بین ارقام متحمل، حساس و حتی مقاوم به بیماری در گلابی (Abdollahi *et al*., 2004; Abdollahi and Salehi, 2017) مطابقت دارد.

بر خلاف شرایط درون شیشه که به دلیل عدم وجود بافت‌های چوبی، تفاوت در سرعت پیشرفت نکروز عامل تمایز ارقام متحمل و مقاوم به بیماری است، در شرایط ارزیابی گلخانه‌ای و باغی، پیشرفت نکروز و زمان توقف آن پس از تلقیح، عامل شناسائی سطح تحمل ارقام به بیماری آتشک محسوب می‌شود (van der Zwet and Keil, 1979; Erfani *et al*., 2013). در شرایط استفاده از شاهد آب مقطر، هیچگونه علائم نکروزی روی شاخه‌چه‌های هر دو رقم گلابی حتی پس از گذشت ۳۳۶ ساعت از تلقیح مشاهده نشد (شکل ۵). نکروز ناشی از باکتری عامل بیماری بر روی شاخه‌چه‌ها آغاز و پیشرفت کرد، بنابراین همانطورکه انتظار می‌رفت احتمال تداخل بین نکروز بازدارنده و نکروز باکتری در این آزمایش طی مدت کشت توام باکتری و میزبان وجود نداشت.

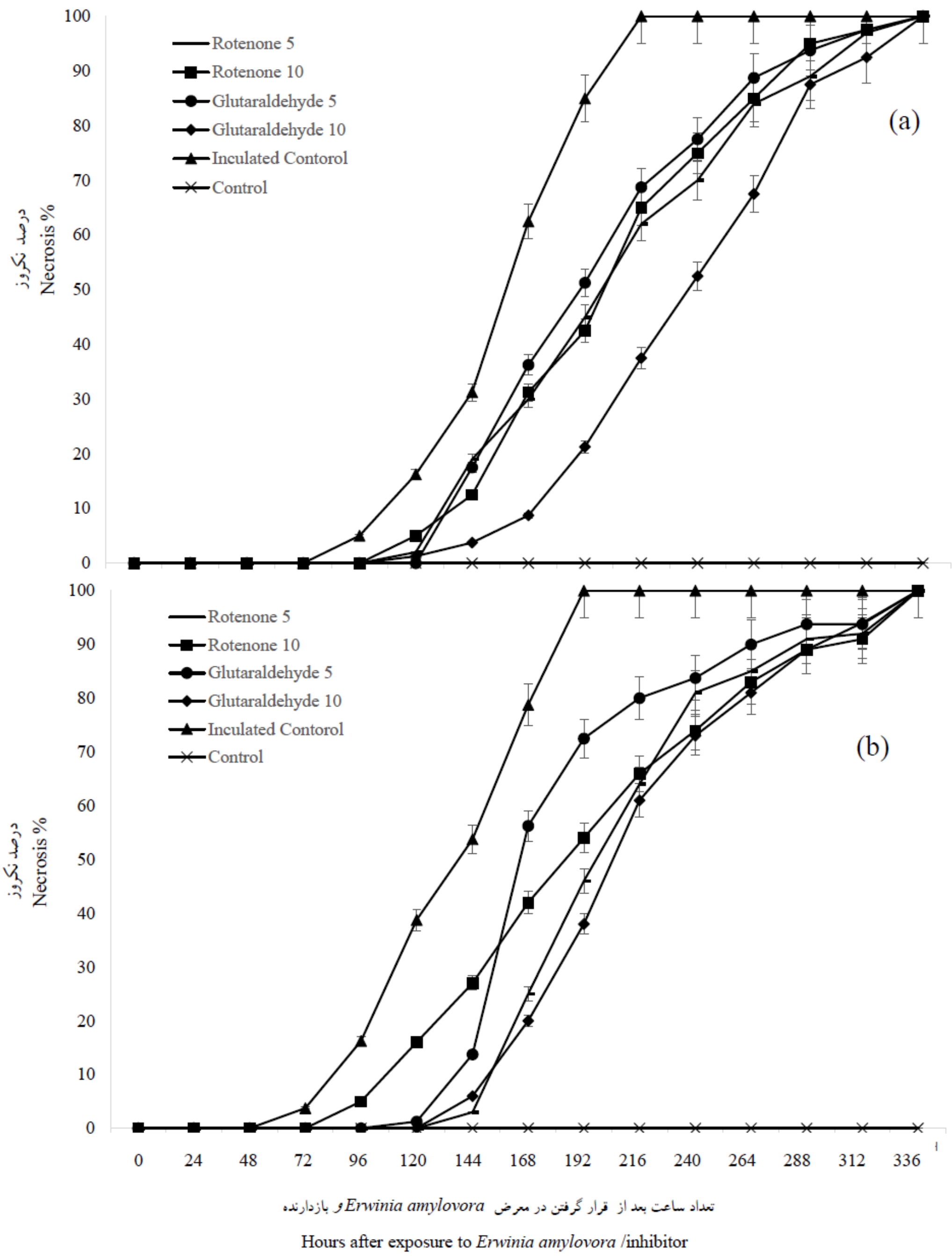


شکل ۴- مقایسه (a): نقطه آغازش نکروز در نوک برگ شاخه‌چه‌های درون شیشه گلابی رقم بارتلت ناشی از افزودن بازدارنده زنجیره انتقال الکترونی کلروپلاستی گلوتارآلدهید و(b): محل آغازش نکروز باکتری *Erwinia amylovora* در قاعده شاخه‌چه و دمبرگ‌های درون شیشه همان رقم گلابی

Fig. 4. Comparison of (a): initiation necrosis point in apex of leaflets of *in vitro* shootlets of pears cv. Bartlett caused by exposure to the glutaraldehyde as chloroplasts electron transport chain inhibitor and (b): initiation necrosis point in base of *in vitro* shootlets and leaflets of the same cultivar caused by *Erwinia amylovora*

استفاده از بازدارنده‌های زنجیره انتقال الکترون میتوکندریائی روتنون و کلروپلاستی گلوتارآلدهید در هر دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، تاخیر در زمان اولیه ظهور اولین علائم نکروز و همچنین کاهش در سرعت پیشرفت نکروز در شاخه‌های درون شیشه هر دو رقم گلابی حساس و متحمل را به همراه داشت (شکل ۵). همچنین مقایسه اثر دو بازدارنده روتنون و گلوتارآلدهید در رقم هاروسوئیت، بیانگر بیشترین تاثیر بازدارنده گلوتارآلدهید در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر در کاهش علائم بود. در حالی که در این رقم، همین میزان روتنون تاثیر کمتری در کاهش علائم نکروز به همراه داشت (شکل ۵).

براساس نتایج این پژوهش، پس از گذشت ۲۱۶ ساعت از تلقیح رقم هاروسوئیت، میزان نکروز در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر روتنون کمتر از ۳۰ درصد و در همین غلظت گلوتارآلدهید حدود ۷۰ درصد بود (شکل ۵). گرچه هر دو غلظت روتنون سبب تاخیر در پیشرفت علائم بیماری در رقم هاروسوئیت شدند، ولی بین دو غلظت این بازدارنده تفاوت قابل توجهی مشاهده نشد. در رابطه با رقم حساس بارتلت نیز گرچه روند عمومی نتایج با رقم هاروسوئیت مشابه بود، ولی با توجه به حساسیت بیشتر این رقم به بیماری، در کلیه شرایط استفاده از بازدارنده‌های زنجیره انتقال الکترون میتوکندریائی روتنون و کلروپلاستی گلوتارآلدهید و در هر دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، سرعت پیشرفت نکروز حدود ۲۴ ساعت نسبت به رقم هاروسوئیت زودتر اتفاق افتاد (شکل ۵). در این رقم نیز در رابطه با تاخیر در بروز علائم نکروز روی سرشاخه‌ها بین دو غلظت بازدارنده روتنون تفاوت قابل توجهی مشاهده نشد.



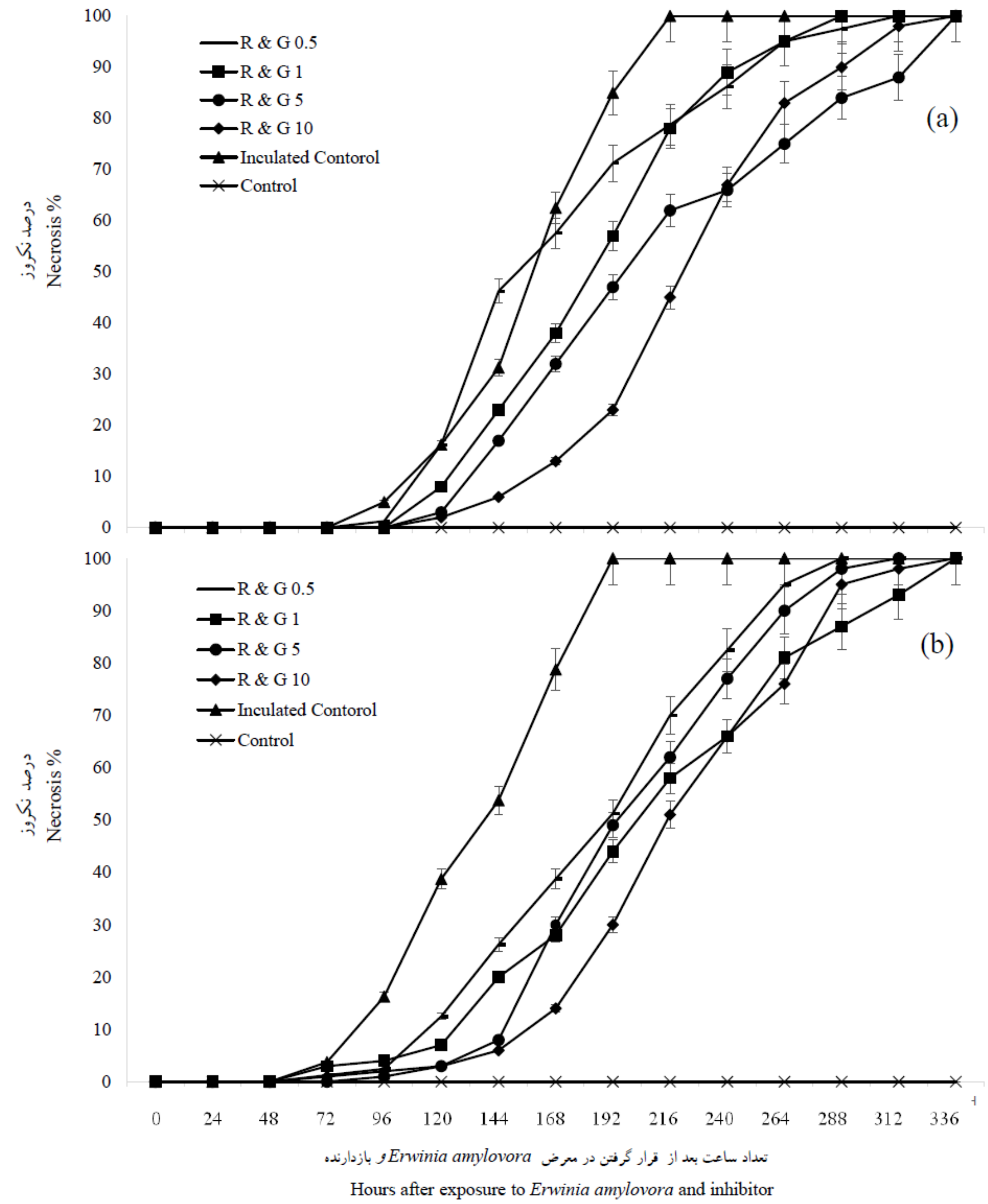
شکل ۵- میانگین زمان ظهور و روند پیشرفت نکروز در شاخه‌چه‌های درون شیشه گلابی رقم هاروسوئیت (a) و بارتلت (b) پس از آلوده‌سازی با باکتری *Erwinia amylovora* و قرارگرفتن در معرض غلظت‌های بازدارنده‌های زنجیره انتقال الکترون میتوکندریائی روتنون و کلروپلاستی گلوتارآلدهید (غلظت‌ها میلی‌گرم بر لیتر می باشند).). نوار خطاها اشتباه استاندارد میانگین ها را نشان می دهند

Fig. 5. Mean of appearance time and the trend of necrosis progress in *in vitro* shootlets of pear cv. Harrow Sweet (a) and cv. Bartlett (b) after inoculation with *Erwinia amylovora* and exposure to concentrations of inhibitors of electron transport chain of chloroplastic glutaraldehyde and mitochondrial rotenone (concentrations are in mg l^{-1}). The error bars represent standard error of means

تاخیر در بروز علائم نکروز بیماری آتشک در شرایط استفاده از بازدارنده زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی گلوتارآلدهید با گزارشات قبلی در این خصوص مطابقت دارد، و استفاده از طیف گسترده‌ای از بازدارنده‌های این زنجیره علاوه بر گلوتارآلدهید، شامل متیل ویولوژن، اوراسیل و DCMU، سبب تاخیر در بروز علائم نکروز با کاهش شدت و سرعت تنش اکسیداتیو حاصل از باکتری *E. amylovora* می شوند (Abdollahi *et al*., 2015). این تاخیر در بروز تنش اکسیداتیو با استفاده از بازدارنده‌های زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی به عنوان شاهد، ثابت‌کننده نقش این زنجیره در اثر متقابل بین پروتئین‌های موثر باکتری عامل بیماری و کلروپلاست‌های میزبان گزارش شده است. علاوه بر این، مطالعات انجام شده توسط طاهری شهرستانی و همکاران (Taheri Shahrestani *et al*., 2017a; Taheri Shahrestani *et al*., 2017b) با استفاده از سویه‌های موتانت باکتری *E. amylovora* شامل موتانت‌های $hrpN^-$، $dspA/E^-$ و $hrpW^-$، شواهد دقیق‌تری مبنی بر احتمال اثر متقابل پروتئین موثر HrpN باکتری با کلروپلاست‌های میزبان را ارائه کرده است. شواهد اولیه مبنی بر نقش روتنون در تاخیر در بروز علائم نکروز بیماری آتشک توسط آذرآبادی و همکاران (Azarabdi *et al*., 2014) ارائه شد.

نتایج پژوهش حاضرنشان می‌دهد که در شرایط بازدارندگی تقریباً یکسان (غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر)، میزان تاثیر بازدارنده زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی گلوتارآلدهید در تنش اکسیداتیو حاصل از بیماری آتشک در هر دو رقم گلابی حساس به بیماری (بارتلت) و متحمل به بیماری (هاروسوئیت) در مقایسه با زنجیره انتقال الکترون میتوکندریائی روتنون بیشتر بود (شکل ۵).

بنابراین بر اساس این بخش از نتایج به نظر می‌رسد میزان تاثیر زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در مقایسه با شرایط استفاده توام از دو بازدارنده زنجیره انتقال الکترون میتوکندریائی روتنون و کلروپلاستی گلوتارآلدهید نیز موید تاثیر بیشتر زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی در تنش اکسیداتیو ناشی از بیماری بود و به نظر نمی‌رسد بازدارندگی هر دو زنجیره، به صورت توام، نقش هم‌افزائی در کاهش شدت تنش اکسیداتیو ناشی از بیماری در دو رقم حساس و متحمل به بیماری داشت (شکل ۶). علاوه بر این، در رقم حساس بارتلت، در شرایط استفاده از بازدارنده زنجیره انتقال الکترون میتوکندریائی روتنون، میزان نزدیکی سرعت پیشرفت علائم نکروز به شرایط استفاده از بازدارنده زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی گلوتارآلدهید بیشتر بود (شکل ۵ و ۶). این نتایج می‌تواند شواهدی اولیه و مقدماتی مبنی بر نقش موثرتر اندامک کلروپلاست در تحمل به بیماری آتشک در رقم متحمل هاروسوئیت باشد.



شکل ۶- میانگین زمان ظهور و روند پیشرفت نکروز در شاخه‌چه‌های درون شیشه گلابی رقم هاروسوئیت (a) و بارتلت (b) پس از آلوده‌سازی با باکتری *Erwinia amylovora* و قرار گرفتن در معرض غلظت‌های توام بازدارنده‌های زنجیره انتقال الکترون میتوکندریائی روتنون (R) و کلروپلاستی گلوتارآلدهید (G) (غلظت‌ها میلی‌گرم بر لیتر می باشند). نوارهای خطا اشتباه استاندارد میانگین ها را نشان می دهند

Fig. 6. Mean of appearance time and the trend of necrosis progress in *in vitro* shootlets of pear cv. Harrow Sweet (a) and cv. Bartlett (b) after inoculation with *Erwinia amylovora* and exposure to concentrations of both inhibitors of electron transport chain of chloroplastic glutaraldehyde (G) and mitochondrial rotenone (R) (concentrations are in mg l^{-1}). The error bars represent standard error of means

براساس این نتایج و همچنین استفاده از گزارشات قبلی مبنی بر نقش تحریک‌کنندگی سیستم دفاع اکتسابی توسط پروتئین موثر HrpN باکتری *E. amylovora* (Oh and Beer, 2005) و تاثیر احتمالی آن بر کلروپلاست‌ها (Taheri Shahrestani *et al*., 2017a; Taheri Shahrestani *et al*., 2017b)، می‌توان این احتمال را بیان کرد که پروتئین موثر HrpN باکتری با تاثیر بیشتر و موثرتر بر زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی در کلروپلاست ارقام متحمل می‌تواند نقش تحریک‌کنندگی سامانه دفاع اکتسابی را در این ارقام ایفا و سبب بروز ساختارهای دفاعی این اندامک به نحو مطلوب‌تری در مقایسه با رقم حساس بارتلت شود. علاوه بر این در بررسی‌های قبلی، ساختار مقاومت در گلابی رقم مقاوم درگزی که با تولید بسیار کم و اندک رادیکال‌های فعال اکسیژن سبب تاخیر در پیشرفت علائم می‌شود (Maleki *et al*., 2022) همچنان به عنوان نقطه ابهامی در تفسیر این اثر متقابل مطرح است که نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش در مرحله مقدماتی بیانگر امکان کاربرد بازدارنده‌های زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی گلوتارآلدهید و میتوکندریائی روتنون برای ایجاد بازدارندگی نسبی در زنجیره انتقال الکترون این دو اندامک و در نتیجه فراهم آوردن امکان مطالعات درون شیشه‌ای برای بررسی تاثیر عوامل و تنش‌های مختلف نظیر بیماری آتشک روی دو اندامک مذکور می‌باشد. این در حالی است که با توجه به آثار سمی ومخرب‌تر استفاده از این مواد، در شرایط گلخانه‌ای و یا باغی، امکان انجام چنین ارزیابی‌هایی در محیط *In vivo* دشوار و یا غیرممکن است. بنابراین با استفاده از غلظت‌های بهینه‌شده‌ی گلوتارآلدهید و روتنون سهم دو اندامک کلروپلاست و میتوکندری در تنش اکسیداتیو، براساس شاخص نکروز، مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که سرعت پیشرفت نکروز در شاخه‌های درون شیشه‌ای هر دو رقم حساس و متحمل گلابی کاهش یافت. ولی بازدارنده گلوتارآلدهید تاثیر بیشتری در کاهش علائم نکروز به همراه داشت.

تاخیر بیشتر در زمان بروز علائم نکروز بیماری در شرایط کاربرد بازدارنده زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی به عنوان شاهد، ثابت‌کننده نقش این زنجیره در اثر متقابل بین پروتئین‌های موثر باکتری عامل بیماری و کلروپلاست‌های میزبان بود و مقایسه آن با اثر روتنون نشان داد که میزان تاثیر زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی تا اندازه‌ای از تاثیر زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی بیشتر بود. علاوه بر این، در رقم حساس بارتلت میزان نزدیکی سرعت پیشرفت علائم نکروز در شرایط استفاده از بازدارنده زنجیره انتقال الکترون میتوکندریائی در

مقایسه با بازدارنده زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی گلوتارآلدهید، بیشتر بود. این موضوع می‌تواند شواهدی اولیه و مقدماتی مبنی بر نقش موثرتر اندامک کلروپلاست در تحمل به بیماری آتشک در رقم متحمل هاروسوئیت باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش در قالب برنامه بلند مدت اصلاح و گزینش ارقام مقاوم به بیماری آتشک درخت گلابی معمولی در پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی (بخش تحقیقات باغبانی سابق- موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر) انجام شد. نگارندگان از زحمات سرکار خانم مهندس زینب صالحی در رابطه با تامین اولیه و نگهداری مواد گیاهی مورد نیاز این پژوهش در شرایط درون شیشه کمال تشکر را دارند.

References

Abdollahi, H. 2010. Pear: Botany, cultivars and rootstocks. Iranian Agricultural Ministry Publications. Tehran, Iran. 210 pp. (in Persian).

Abdollahi, H., and Salehi, Z. 2017. Histology of oxidative stress and generation of reactive oxygen species against progress of fire blight causal agent in pear cultivars. Seed and Plant Journal 33-2: 139-162 (in Persian).

Abdollahi, H., Erfaninia, K., Ghahremani, Z., Nasiri, J., and Salehi, Z. 2017. Reactivation of electron flow in chloroplasts of *in vitro* shootlets of apple through elimination of carbon source and evaluation of its activity by inhibitors of electron transport chain and chlorophyll fluorescence quenching. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 131: 377-389.

Abdollahi, H., Ghahremani, Z., Erfaninia, K., and Mehrabi, R. 2015. Role of electron transport chain of chloroplasts in oxidative burst of interaction between *Erwinia amylovora* and host cells. Photosynthesis Research 124: 231-242.

Abdollahi, H., Muleo, R., and Rugini, E. 2005. Study of basal growth media, growth regulators and pectin effects on micropropagation of pear (*Pyrus communis* L.) cultivars. Seed and Plant Journal 21: 373-384 (in Persian).

Abdollahi, H., Ruzzi, M., Rugini, E., and Muleo, R. 2004. *In vitro* system for studying the interaction between *Erwinia amylovora* and genotypes of pear. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 79: 203-212.

Aldwinckle, H. S., and Preczewski, J. L. 1976. Reaction of terminal shoots of apple

cultivars to invasion by *Erwinia amylovora*. Phytopathology 66: 1439-1444.

Azarabadi, S., Abdollahi, H., Torabi, M., and Hassani, M. 2014. Effects of mitochondrial electron transport inhibitor, on reduction of fire blight (*Erwinia amylovora*) damages in *in vitro* condition. pp. 281. In Proceedings of the 21th Iranian Plant Pathology Congress, 23-26 August, Urmieh, Iran. (in Persian).

Azarabadi, S., Abdollahi, H., Torabi, M., Salehi, Z., and Nasiri, J. 2016. ROS generation, oxidative burst and dynamic expression profiles of ROS-scavenging enzymes of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) in response to *Erwinia amylovora* in pear (*Pyrus communis* L). European Journal of Plant Pathology 147: 279-294.

Baldo, A, Norelli, J. L., Farrell, R. E., Bassett, C. L., Aldwinckle, H. S., and Malnoy, M. 2010. Identification of genes differentially expressed during interaction of resistant and susceptible apple cultivars (*Malus*× *domestica*) with *Erwinia amylovora*. BMC Plant Biology 10: 1. http://www.biomedcentral.com/1471-2229/10/.

Bell, A. C., Ranney, T. G., Eaker, T. A., and Sutton, T. B. 2004. Resistance to fire blight among flowering pears and quince. HortScience 40: 413-415.

Bhattacharjee, S. 2011. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. pp. 1-30. In: Dutta Gupta, S. (ed.) Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Bokszczanin, K., Dondini, L., and Przybyla, A. A. 2009. First report on the presence of fire blight resistance in linkage group 11 of *Pyrus ussuriensis* Maxim. Journal of Applied Genetic 50: 99-104.

Calenge, F., Drouet, D., Denance, C., Van de Weg, W. E., Brisset, M. N., Paulin, J. P., and Durel, C. E. 2005. Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies. Theoretical and Applied Genetic 111: 128-135.

Dondini, L., Pierantoni, L., Gaiotti, F., Chiodini, R., Tartarini, S., Bazzi, C., and Sansavini. S. 2004. Identifying QTLs for fire-blight resistance via a European pear (*Pyrus communis* L.) genetic linkage map. Molecular Breeding 14: 407-418.

Durel, C. E., Denance, C., and Brisset, M. N. 2009. Two distinct major QTL for resistance to fire blight in co-localize on linkage group 12 in apple genotypes

Evereste and *Malus floribunda* clone 821. Genome 52: 139-147.

Erfani, J., Abdollahi, H., Ebadi, A., Fatahi Moghadam, M. R., and Arzani, K. 2013. Evaluation of fire blight resistance and the related markers in some European and Asian pear cultivars. Seed and Plant Journal 29-1: 659-672 (in Persian).

Heldt, H. W. 2005. Plant biochemistry. Elsevier Academic Press, Burlington. USA. 622 pp.

Khan, A. M., Durel, C. E., Duffy, B., Drouet, D., Kellerhals, M., Gessler, C., and Patocchi, A. 2007. Development of molecular markers linked to the 'Fiesta' linkage group 7 major QTL for fire blight resistance and their application for marker-assisted selection. Genome 50: 568-577.

Leblay, C., Chevreau E., and Robin L. M. 1991. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivar (*Pyrus communis* L.). Plant Cell, Tissue Organ Culture 25: 99-105.

Maleki, R., Abdollahi, H., and Piri, S. 2022. Variation of active iron and ferritin content in pear cultivars with different levels of pathogen resistance following inoculation with *Erwinia amylovora.* Journal of Plant Pathology 104: 281-293.

Moller, I. M. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 52: 561-91.

Nourmohammadi, N., Abdollahi, H., Moeini, A., and Roohalamin, E. 2015. Effects of growth media and Fe source on micropropagation and rooting of semi-dwarf pear rootstocks, Pyrodwarf and OH×F87. Seed and Plant Journal 31-1: 265-278 (in Persian).

Oh, C. S., and Beer, S. V. 2005. Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. FEMS Microbiology Letters 253: 185-192.

Oitto, W. A., van der Zwet, T., and Brooks, H. J. 1970. Ratings of pear cultivars for resistance to fire blight. HortScience 5: 474-476.

Quoirin, M., and Lepoivre, P. 1977. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de Prunus. Acta Horticulturae 78: 437-442.

Sarowar, S., Zhao, Y., Soria-Guerra, R. E., Ali, S., Zheng, D., Wang, D., and Korban, S. S. 2011. Expression profiles of differentially regulated genes during the early stages of apple flower infection with *Erwinia amylovora.* Journal of Experimental Botany 62: 4851-4861.

Steiner, P. W. 2000. Integrated orchard and nursery management for the control of fire

blight. pp. 339-358. In: Vanneste, J. L. (ed.) Fire blight: The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CAB International Press, Wallingford. United Kingdom.

Taheri Shahrestani, A., Abdollahi, H., Yakhchali, B., Mehrabi, R., and Eini Gandomani, O. 2017a. Comparison of the effects of *Erwinia amylovora* effecter proteins on pear cultivars in active and inactive chloroplastic electron transport chain conditions. New Genetic 3: 333-345.

Taheri Shahrestani, A., Abdollahi, H., Yakhchali, B., Mehrabi, R., and Eini Gandomani, O. 2017b. Response of pear cultivars to invasion of mutant strains of fire blight causal agent (*Erwinia amylovora*) based on H_2O_2 generation. Seed and Plant Journal 33-1: 315-323 (in Persian).

Tsiantos, J., and Psallidas, P. 2004. Fire blight resistance in various loquat, apple and pear cultivars and selection in Greece. Journal of Plant Pathology 86: 227-232.

Van der Zwet, T., and Keil, H. L. 1979. Fire blight: A bacterial disease of Rosaceous plants. United States Department of Agriculture. Agricultural Handbook No. 510. 650 pp.

Venisse, J. S., Gullner, G., and Brisset, M. N. 2001. Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. Plant Physiology 125: 2164-2172.

Venisse, J. S., Malony, M., Faize, M., Paulin, J. P., and Brisset, M. N. 2002. Modulation of defense responses of *Malus* spp. During compatible and incompatible interaction with *Erwinia amylovora*. Journal of Molecular Plant-Microbe Interaction 15: 1204-1212.

Vrancken, K., Schoofs, H., Deckers, T., and Valcke, R. 2012. Real time qPCR expression analysis of some stress related genes in leaf tissue of *Pyrus communis* cv. Conference after infection with *Erwinia amylovora*. Trees Structure and Function 26: 67–73.

Xie, Z., and Chen, Z. 2000. Harpin induced hypersensitive cell death is associated with altered mitochondrial functions in tobacco cells. Molecular Plant-Microbe Interaction 13: 183-190.